

平成18年度 学術創成研究費 研究進捗状況報告書（中間評価用）

平成18年3月31日現在

ふりがな	いそがい あきら		②所属研究機関・ 部局・職		奈良先端科学技術大学院大学 副学長			
①研究代表者 氏名	磯貝 彰							
③研究課題名 (英訳名)	植物自家不和合性の分子基盤 (Molecular basis of plant self-incompatibility)							
④研究経費 (千円未満切捨) <small>平成16,17年度使用内訳は支出額、平成18年度以降の交付額は内約額、使用内訳は支出予定額を記入</small>	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円) <平成18年度以降は支出予定額>				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成16年度	77,500	77,500	33,457	31,660	1,390	9,788	1,203
	平成17年度	85,700	85,700	17,251	31,657	1,309	34,794	687
	平成18年度	79,900	-	7,000	35,000	1,800	35,000	1,100
	平成19年度	78,200	-	5,300	35,000	1,800	35,000	1,100
	平成20年度	81,200	-	5,300	35,000	3,800	35,000	2,100
	総計	402,500						
⑤研究組織(研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担(研究実施計画に対する分担事項)					
磯貝 彰	奈良先端科学技術大学院大学・副学長	生物有機化学・植物生化学	全体のとりまとめ、自家不和合性の蛋白質からの解析					
柴 博史	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助手	植物分子生物学・生理学	自家不和合性の遺伝子からの解析・アブラナの花粉因子の優劣性決定機構の解析					
岩野 恵	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助手	植物生理学・細胞生物学	自家不和合性の電子顕微鏡・光学顕微鏡による細胞レベルの解析					
円谷徹之	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助手	植物分子生物学・生理学	ナス科・バラ科植物の自家不和合性機構					
渡辺正夫	東北大学大学院・生命科学研究所・教授	植物分子遺伝育種学	自家不和合性変異体・不和合性形質転換体の作出および多様な遺伝子座のゲノム解析					
蔡 晃植	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授	植物病理学・分子生物学	自家不和合性反応と自然免疫機構の対比					

⑥当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)

自家不和合性は、植物が自殖弱勢を防ぎ、種内の遺伝的多様性を維持するための優れた機構である。いわゆる免疫系を持たない植物が、如何にして自己と非自己の花粉を識別しているのか、我々の研究の目的は、その長年の謎の解明にある。

古典的な遺伝学的解析は、この自他識別反応の多くが、1 遺伝子座 (S 遺伝子座と呼ぶ) 支配の現象であることを明らかにした。申請者らは、アブラナ科植物およびナス科・バラ科植物を材料に S 遺伝子座の解析を進め、いずれも多型性の 2 因子 (雌ずい因子と花粉因子) をコードしていることを世界に先駆けて明らかにしてきた。すなわち、アブラナ科植物では雌ずい因子は受容体型キナーゼ SRK であり、花粉因子はそのリガンド SP11 であった。ナス科・バラ科植物では、雌ずい因子は RNA 分解酵素 S-RNase であることが知られてきたが、花粉因子は F-box 蛋白質 SLF であった。

雌ずい因子と花粉因子の同定が完了し、自家不和合性研究はこれら因子の相互作用から花粉の発芽・伸長抑制の機構解明を主課題とする第 2 ステージを迎えている。本研究では、アブラナ科植物においては、花粉リガンド SP11 による受容体キナーゼ SRK の活性化に始まり自己花粉の発芽・伸長阻害に至るまでの乳頭細胞内の情報伝達経路の解明が中心となる。特に、この情報伝達経路上の鍵因子として最近発見した膜結合型キナーゼ MLPK の機能解明は重要課題である。ナス科・バラ科植物においては、花粉側因子の有力候補として発見した F-box 蛋白質 SLF の機能解明が焦点となる。これまでに見出してきた上記因子を手がかりに徐々に経路を拡大し、最終的に得られた知見を統合することで自家不和合性の分子的基盤を確立することを目指している。

⑦これまでの研究経過

1. 本研究は、学術創成研究費の趣旨の 3 つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。
2. 研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

1. 本研究の学術創成上の観点：創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

本研究は、自家不和合性における自他識別機構の解明を目指すものであるが、同時に、植物における細胞外情報の受容と情報伝達システムという新研究領域を切り拓くと考えられる。また、類似の自他識別機構の存在が、菌類や動物でも見出されつつあり、生物に共通する新たな一般的概念を確立することが期待される。

2. 本研究の進捗状況

本研究は、アブラナ科植物およびナス科・バラ科植物を対象に自家不和合性の分子的理解を目指すものであり、生物有機化学、生物化学、植物生理学、細胞生物学、植物分子生物学、植物遺伝学など専門を異にする研究者が、それぞれの得意な手法を駆使して、協力して、遺伝子レベル、蛋白質レベル、細胞レベル、個体レベルでその機構解明に努めてきた。また、本研究では、研究代表者および分担者以外に、研究協力者や、本研究費で雇用したポストドク研究者が研究に加わって、研究を行ってきた。その結果、この 2 年間で以下に述べる様な重要な知見を得ている。特に、アブラナについては、自家不和合性の自他識別機構のモデル図をかなり拡張することができた。

(1) アブラナ科植物の自家不和合性

1) 花粉リガンド SP11 による受容体キナーゼ SRK の活性化機構

植物は 600 種類以上もの受容体型キナーゼを持つが、リガンドによる活性化機構、すなわち分子スイッチとしての変化が蛋白質レベルで解析された例は皆無である。我々は、SP11 蛋白質添加により SRK の自己リン酸化レベルが上昇することを示すと共に、biotin 標識した SP11 蛋白質を用いることで活性型の SRK を柱頭細胞膜上から単離することに成功した。さらに、植物培養細胞に SRK 遺伝子を導入することで、高親和性の SP11 受容体を再構成することに成功した (投稿中、植物生理学会)。これらは、今後 SP11-SRK 間の特異的相互作用や SRK の活性化機構を解明する糸口となることが期待される。

2) 乳頭細胞内における生理的变化の解析

他家および自家受粉時における乳頭細胞内の生理的变化を可視化するために、Ca²⁺センサーの Yellow cameleon と (Plant Physiol., 2004)、蛍光標識アクチン結合蛋白質を発現させた植物体

⑦これまでの研究経過 つづき

を作製し(農芸化学会)、受粉時の変化を on time に解析した。さらに、他家および自家受粉後の乳頭細胞内の細胞内構造の変化を電子顕微鏡レベルで比較解析した。これらの解析の結果、花粉表層には、乳頭細胞の細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇に引き続きアクチン骨格の再編成や花粉への水の供給を誘導する未知の「和合シグナル分子」が存在すること、SRK の下流の不和合性シグナルはその和合シグナルを何らかの形で阻害していること、が強く示唆されてきた。

3) 膜アンカー型細胞質キナーゼ MLPK の機能解析

MLPK には、転写開始点の異なる 2 つのアイソフォームが存在すること、柱頭では両方発現していることが示された。N 末端のアミノ酸配列が異なるが、一方はミリストイル基を介して、他方は疎水性アミノ酸領域を介して、いずれも細胞膜上に局在することが示された。また、ミリストイル化領域を改変して細胞膜局在性を欠失させた MLPK は、自家和合性 *mlpk* 変異株の表現型を相補せず、自家不和合性の情報伝達に、MLPK の細胞膜局在性が必須であることが示唆された (植物生理学学会)。

4) MLPK の標的分子の探索

酵母 Two-hybrid 法により、MLPK と相互作用する柱頭蛋白質を探索し、複数の候補因子を同定した。その内の 4 因子については、発現蛋白質を用いて *in vitro* における結合能および発現 MLPK による被リン酸化能が確認され、MLPK の有力な標的分子候補であることが示唆された (未発表)。

5) 和合受粉時に発現変動する柱頭遺伝子の網羅的解析

アブラナ科植物の柱頭 EST カタログ化と cDNA マイクロアレイの作製を進めた。これを用いての解析に先立ち、市販のシロイヌナズナのマイクロアレイを用いて解析を進めた結果、 Ca^{2+} シグナリングに関わる遺伝子を始め、受粉後速やかに変動する遺伝子が多数見出された。これらの多くは、花粉の表層物質を柱頭に処理することでも誘導されることから、花粉表層中に和合受粉反応を誘起する物質「和合シグナル分子」が含まれることが、この系でも、示唆された (未発表)。

6) S 複対立遺伝子間の優劣性発現の機構解明

花粉側で優劣性の関係を示す 2 つの S 複対立遺伝子を持つヘテロ体において、劣性側の *SP11* 遺伝子の発現が抑制される原因を解明するために、*SP11* 遺伝子周辺の DNA メチル化レベルを解析した。その結果、劣性側の *SP11* 遺伝子のプロモーター領域が、*SP11* の発現開始に先立ち、薬タペート組織で特異的にメチル化されることを発見した (Nature Genet., 2006)。この発見は、植物において組織および時期特異的な *de novo* メチル化が見出された最初の例であるのみならず、優劣性という古典的な遺伝学の現象にエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与していることを示した初めての例である。

7) 自家不和合性反応と病原抵抗性反応との対比

不和合受粉時および非親和性菌接種時には、共通して Ca^{2+} 変動と活性酸素発生が認められる。菌接種時の活性酸素の発生には、 Ca^{2+} 結合領域を持つ *OsrbohA* と *OsrbohE* が協調的に関与することを見出した (Plant Biotech., 2005)。

(2) ナス科・バラ科植物の自家不和合性

1) バラ科植物の雌ずい因子 S-RNase と花粉因子 SLF の相互作用解析

バラ科植物 *Prunus mume* において同定された S-RNase と SLF 間の相互作用を酵母 Two-hybrid 法を用いて解析したが、S 複対立遺伝子の異同に関わらず、ゴマノハグサ科で報告された様な結合活性は検出されなかった。リン酸化や植物特有の糖鎖などの修飾が、両者間の結合に必須である可能性が示唆された (未発表)。

2) ナス科植物の花粉因子 SLF の同定

ナス科植物 *Petunia inflata* の花粉因子と報告されている *SLF2* の配列を基に *P. hybrida* の 4 つの S 複対立遺伝子より *SLF2* と 93-96% の相同性を示す *SLFs* をクローニングすることに成功した。いずれも S 遺伝子座に連鎖し花粉で発現していることが確認されたが、S-RNase RNase 間の相同性 42-69% と比較して多型性はかなり低いものであった。また、クローニングした 2 つの *SLFs* を導入した *P. hybrida* の形質転換体を作成したが、花粉因子としての機能を支持する形質転換体は今のところ得られていない (未発表)。

⑧特記事項

これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。

本研究発足時、推薦者は、本研究が単に自家不和合性の分子基盤の理解にとどまらず、植物における細胞外情報の識別機構とその情報伝達システム研究の研究領域へ貢献すること、また動物や微生物の自他識別機構との対比という比較生物学へ貢献することを期待していた。こうした観点をふまえて、以下、研究者らの成果の自己評価をすることとする。

自家不和合性研究は、S遺伝子座にある雌ずい因子と花粉因子の同定を主要課題とする第1ステージから、本研究での、それらの相互作用から花粉の発芽・伸長抑制に至るまでの機構解明を主要な課題とする第2のステージに入ったといえる。本研究グループは両因子の第1ステージ以来の研究のアクティビティーを維持し、研究を継続していると自負している。本課題の申請時ヒアリング直前にも、アブラナ科植物の自家不和合性変異株の原因遺伝子の解明に関する報告(Science, 2004)を行ったが、申請時のヒアリングでは、アブラナの自家不和合性については、(1) SP11のSRKによる受容の特異性機構、(2) SP11受容後の乳頭細胞内のシグナルネットワークの解明、(3) 花粉因子 SP11の優劣性決定機構の解明、を主要な課題とした。それらの課題について、それぞれ、本報告に記載したように、多くの成果を上げている。これらの成果は、自家不和合性を文字通り分子レベルで理解したいという立脚点にたった、遺伝子レベルでの研究、蛋白質レベルでの研究、さらには、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた細胞レベル、あるいは、変異体という個体レベルでの研究を総合化することによって得られたものであることが、本研究の特徴である。それによって、自他識別機能とその情報伝達ネットワークのモデル図を精密化し、乳頭細胞の生殖に関わる細胞としての特殊性を理解することができるようになってきた。

植物におけるレセプターキナーゼ研究は、そのリガンドが明らかなのは極めて少なく、我が国において優れた研究が展開されているが、その中でも、そのシグナルネットワーク研究として、本研究は、先頭を切っているものである。また、本研究で、和合シグナル分子の存在とそれが花粉表層にあることを示し得たことは、今後、自家不和合性研究ばかりでなく、種間不和合の問題や、生殖隔離の問題に新たな視点を与え、植物の生殖生物学に貢献するところが大きい。さらに、花粉因子の優劣性決定機構の解明において、植物では世界で初めて、*de novo*のDNAメチル化が、遺伝子の発現調節に関わっていることを実証することができた。メンデルの優劣性の法則の多くは、劣性側遺伝子の欠陥として説明されているが、その中で、本研究で示した mRNA の発現調節レベルでの優劣性決定機構は極めてユニークなものであり、優劣性の理解に新たな視点をもたらした。こうした機構が、他の生物現象にもあるかどうか、極めて興味深く、比較生物学の観点からも重要な発見であると考えている。これらのように生物学に広く影響を持つと思われる本研究の成果は、この現象が極めて限定された細胞間で起きている現象であることから得られたもので、この材料が、生物学にとって、きわめて優れた研究材料であることを示している。

一方、ナス科・バラ科の自家不和合性の機構解明研究はやや遅れているが、現在、この分野では、自他識別機構として多様なモデルが提出される中、どのモデルもコンセンサスが得られていない。今回、形質転換可能な植物において真の花粉因子候補が得られたことは、ナス科・バラ科の自家不和合性研究の進展に大きく貢献できるものと考えている。また、アブラナ科型、および、ナス科・バラ科型の2つの典型的な自家不和合性を研究することで、植物の生殖戦略の多様性を示すことができると考えている。

以上、総合して、本研究のこれまでの成果は、推薦者の期待に良く応えているものと考えている。また、18年度以降の研究の方向も明確であり、本研究を継続することで、自家不和合性現象の解明のみならず、広く生物学に貢献できる多くの成果を得ることができものと考えている。

⑨研究成果の発表状況

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限ります。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会等における発表状況について、2頁以内に記入してください。

発表論文

1. Shiba, H., Kakizaki, T., Iwano, M., Tarutani, Y., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Dominance relationships between self-incompatibility alleles controlled by DNA methylation. *Nature Genet.* 38, 297-299 (2006).
2. Kakizaki, T., Takada, Y., Fujioka, T., Suzuki, G., Satta, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., and Watanabe, M. Comparative analysis of the *S*-intergenic region in class-II *S* haplotypes of self-incompatible *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Genes Genet. Syst.* 81, 63-67 (2006).
3. Tsujita, T., Ishii, A., Tsukada, H., Matsumoto, M., Che, F.-S., Seya, T. Fish soluble Toll-like receptor (TLR) 5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24, 2193-2199 (2006).
4. Watanabe, M., Suzuki, G., Shiba, H., and Takayama, S. Molecular mechanisms of self-incompatibility in Brassicaceae. In "Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition)" (Ed. da Silva, J.A.T.), Global Science Books, Kagawa, pp. 552-555 (2006).
5. Takayama, S., and Isogai, A. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 467-489 (2005).
6. Yoshie, Y., Goto, K., Takai, R., Iwano, M., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.-S. Function of the rice gp91^{phox} homologs *OsrbohA* and *OsrbohE* genes in ROS-dependent plant immune responses. *Plant Biotech.* 22, 127-135 (2005).
7. Takada, Y., Nakanowatari, T., Sato, J., Hatakeyama, K., Kakizaki, T., Ito, A., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M. Genetic analysis of novel intra-species unilateral incompatibility in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) L. *Sex. Plant Reprod.* 17, 211-217 (2005).
8. Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.-S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., and Isogai, A. Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3562-3571 (2004).
9. Fujiwara, S., Tanaka, N., Kaneda, T., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.-S. Rice cDNA microarray based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. *Mol. Plant Microb. Interact.* 17, 986-998 (2004).

国際会議

1. Takai, R., Che, F.-S., and Isogai, A. Analysis of the flagellin perception system in rice. XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Merida, December 14-19, 2005.
2. Kakita, M., Murase, K., Shimosato, H., Iwano, M., Shiba, H., Isogai, A., and Takayama, S. Functional analysis of MLPK, a receptor-like cytoplasmic kinase involved in *Brassica* self-incompatibility system. 4th NAIST Bio-COE International Symposium, Nara, December 16-17, 2005.
3. Fujiwara, S., Tanaka, N., Kaneda, T., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.-S. Analysis of flagellin recognition signaling pathway during immune responses in cultured rice cells. 4th NAIST Bio-COE International Symposium, Nara, December 16-17, 2005.
4. Takayama, S., and Isogai, A. S receptor kinase signaling in the *Brassica* self-incompatibility. Protein Phosphorylation in Plant Signaling 2005, Tsukuba, October 20-21, 2005.

⑨研究成果の発表状況

国際会議（続き）

5. Iwano, M., Shiba, H., Che, F.-S., Takayama, S., and Isogai, A. Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. The Annual Meeting of The American Society of Plant Biologists (ASPB), Seattle, July 16-20, 2005.
6. Shimosato, H., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Isogai, A., and Takayama, S. Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding receptor involved in *Brassica* self-incompatibility. The Annual Meeting of The American Society of Plant Biologists (ASPB), Seattle, July 16-20, 2005.
7. Fujiwara, S., Isogai, A., and Che, F.-S. Rice cDNA microarray based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. 3rd NAIST Bio-COE International Symposium, Nara, January 17-19, 2005.
8. Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S. Two MLPK isoforms localize to plasma membrane by different mechanisms. 3rd NAIST Bio-COE International Symposium, Nara, January 17-19, 2005.
9. Takayama, S., and Isogai, A. Molecular basis of plant self-incompatibility: its diversity and common basic concept. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats, Shima, November 8-13, 2004.
10. Fujiwara, S., Tanaka, N., Kaneda, T., Takayama, S., Isogai, A., and Che, F.-S. Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. 2nd EPSO conference “Interactions in plant biology: cells, plants and communities”, Ischia, October 10-14, 2004.
11. Takai, R., Che, F.-S., and Isogai, A., Analysis of the flagellin perception system in rice. 2nd EPSO conference “Interactions in plant biology: cells, plants and communities”, Ischia, October 10-14, 2004.
12. Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., A membrane-anchored protein kinase, MLPK, involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. 18th International Congress on Plant Growth Substances, Canberra, September 20-24, 2004.
13. Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.-S., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., A membrane-anchored serine/threonine protein kinase, MLPK, involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction (ICSPR), Beijing, August 20-24, 2004.
14. Takada, Y., Nakanowatari, T., Sato, J., Hatakeyama, K., Kakizaki, T., Ito, A., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M. Genetic analysis of novel intra-species unilateral incompatibility in *Brassica rapa* (syn. *campestris*) L. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction (ICSPR), Beijing, August 20-24, 2004.
15. Kakizaki, T., Takada, Y., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., and Watanabe, M. Genomic organization of the S-intergenic region of the class-II S haplotypes in *Brassica campestris*. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction (ICSPR), Beijing, August 20-24, 2004.
16. Iwano, M., Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation in cultured rice cells induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae*. 8th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy, Kanazawa, June 7-11, 2004.

国内学会

- | | |
|----------|--------------------------------|
| 日本農芸化学会 | 特別シンポジウムでの招待講演他 11 件 |
| 日本分子生物学会 | スペシャルシンポジウムでの招待講演他 2 件 |
| 日本植物生理学会 | シンポジウムでの招待講演他 1 件 |
| その他 | 日本免疫学会異分野交流教育セミナーでの招待講演など 10 件 |